

## 栄養成分によるがん化・老化予防効果と ゲノム安定性制御機構の研究

吉岡 研一

国立がん研究センター研究所発がん・予防研究分野 主任研究員

白川 仁

東北大学大学院農学研究科栄養学分野 准教授

### 緒言

がんは、加齢がリスク要因となり、ゲノム不安定性と多数の変異を伴って発症している。このタイプ（加齢がリスク要因となるタイプ）のがんの罹患率は、過去数十年間で大きく上昇し、現在では、国民の半数近くが罹患し、約3分の1の死因となっている。この罹患率の上昇は、近年の食習慣変化に起因していると考えられる。実際、がん罹患率は、食習慣の差異で大きく異なることが知られている。これらのことから、現在、がん予防のための“栄養学的な概念の構築”が急務に望まれる課題である。

ゲノム不安定性は、広くDNA修復因子が変異した背景で認められ、これががんの促進要因になることが知られている。しかしながら、実際のヒトのがんは、ほとんどの場合で素因となるDNA修復能の異常がないにも関わらず、ゲノム不安定性を伴って発症している。このことは、正常な細胞でも、DNA修復能が低下し得ることを示唆している。実際、遺伝的にDNA修復能が正常な背景でも、広く老化状態の細胞には、DNA損傷が蓄積しており、これが細胞老化の原因になっていることが知られている<sup>1)</sup>。これまでに我々は、『細胞に自然発生的に現れる“ゲノム不安定性のリスク要因（DNA修復能が低下する要因）”』に注力し、細胞が増殖停止する過程では、ヒストンH2AXの発現レベルが著しく低下していること、これに伴って“DNA修復能が低下”しており、これがゲノム不安定性のリスク要因となっていること、を見出した<sup>2-4)</sup>。実際、H2AXは、細胞の増殖活性に貢献すると同時に、ゲノム安定性に必須な（DNA損傷部位で $\gamma$ H2AX fociの形成、DNA修復因子群を集積、修復機構を活性化する）ことが示されている<sup>5)</sup>。重要なことに、H2AXレベルが低下した状態は、ARF/p53経路によって制御・維持されている<sup>6,7)</sup>。このため、ゲノ

ム安定性が保持される限りは、ARF/p53経路が継続的に機能的であり、細胞はH2AXレベルが低下した静止状態で継続的に維持される<sup>8)</sup>。これに対して、この状態の細胞は“DNA修復能が低下”しているため、過剰な増殖ストレスによりDNA複製に伴うDNA損傷に起因したゲノム不安定性が生じてしまう<sup>3,6)</sup>。このため、ARF/p53経路が変異し、H2AX発現が回復した不死化細胞の出現を許容してしまうこと、などが明確になってきた（我々の研究成果から）<sup>9)</sup>。

近年、“がん予防”と“寿命延伸”は同時に発揮される効果であることが示唆されている。実際、赤ワインポリフェノール・レスベラトロールやコーヒーポリフェノール・クロロゲン酸などの摂取で、寿命延伸とがん予防の両方の効果が同時に獲得できることが、疫学や動物実験などによって示されている。重要なことに、ここで認められている“がん予防”の効果は、広く“ゲノム不安定性を伴って発症するタイプのがん（加齢がリスク要因となるがん）”に対して認められる。このことから、“ゲノム安定性の効果”の結果として“がん予防”の効果が現れている可能性が考えられる。重要なことに、ゲノム安定性は、“DNA損傷修復”に伴う効果であることから、ゲノム安定性が継続的に保持される背景では、DNA損傷が蓄積していないものと考えられる。このことは、細胞老化が、広くDNA損傷の蓄積に伴って誘導される点に鑑み、ゲノム安定性が保持される背景は“老化を防御する効果”にも貢献していると期待され、広く老化関連疾患の防御効果と寿命延伸効果を誘導する基本的な制御機構として機能している可能性が考えられる。

本研究では、ポリフェノール等の食品成分（機能性食品）によってもたらされる“がん予防”と“寿命延伸”の効果につき、その作用点の解明、さらに、その栄養学的な効果を明確にすること、を最終ゴールとしている。

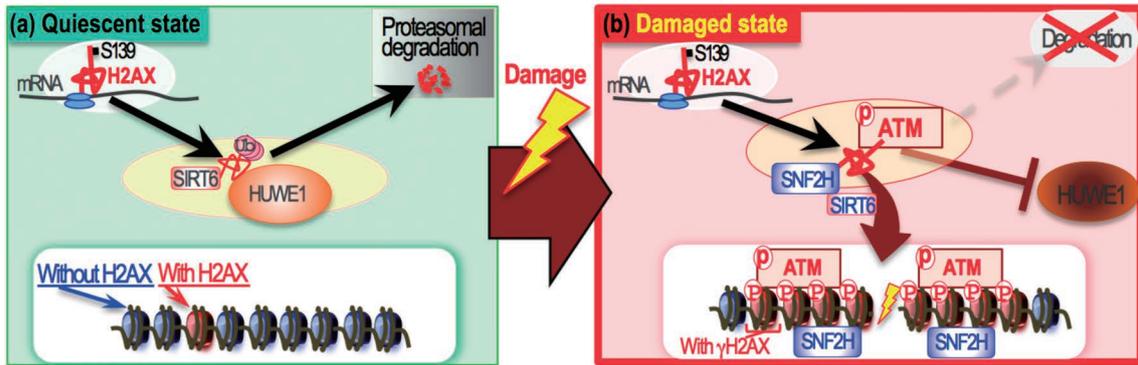


図1 一過的なH2AX発現に伴うDNA二重鎖切断の修復

正常細胞はH2AXレベルの低下に伴って増殖停止している。この状態の細胞でも、DNA二重鎖切断は一過的なH2AXの発現誘導に伴って修復される。

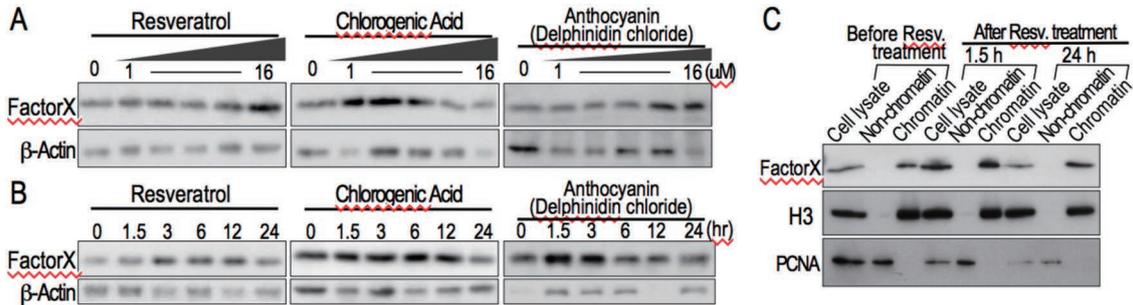


図2 ポリフェノール処理による一過的なFactor X発現

正常細胞はH2AX低下に伴って増殖停止しているため、この状態の細胞はDNA修復能が低下しており、しばしばDNA損傷の蓄積が認められる。ポリフェノールを処理によってDNA修復に関わるFactor Xの発現が一過的に誘導され (A and B)、クロマチンに導入されることが示された (C)。

この目的のため、“*in vitro*のメカニズム解析”と“動物を用いた栄養学的な解析”から遂行した。細胞を用いた*in vitro*の機能解析では、DNA修復能が低下した背景でのDNA修復能の活性化、この時のDNA損傷の蓄積状態、さらに、これに伴う細胞の不死化に対する防御効果、を明確にすることを目指した。特に、最近我々が見出した「DNA二重鎖切断」に対して誘導される一過的なH2AX発現に伴う修復能の活性化機構 (図1)<sup>9)</sup>と同様に、修復能が活性化されるかという点に注力して解析した。また、動物を用いた*in vivo*における栄養学的な解析では、発がんに対する防御効果を明確にすることを目指した。

## 結 果

### ポリフェノールによるゲノム安定性効果

ゲノム不安定性のリスクが、H2AXレベルの低下した静止状態で上昇していると考えられることから、本研究では、まず、この状態の細胞に対して、ポリフェノール

による“ゲノム安定性に対する効果”を明確にすることとした。tSD-3T3プロトコールによる培養法<sup>3)</sup>で静止状態の細胞を準備し、レスベラトロール処理によるDNA修復に関わるFactor Xの発現に対する影響を解析した。この結果、レスベラトロールによってFactor Xが一過的に誘導されることが見出された (図2A、B)。このとき誘導されたFactor Xは、効果的にクロマチンに導入されていた (図2C)。これまでの我々の解析で、静止した細胞状態における“一過的なFactor Xの発現上昇”はDNAの修復過程で認められている点に鑑み<sup>10)</sup>、『レスベラトロールが一過的にFactor Xを発現誘導する』という結果は、レスベラトロールが一過的にDNA修復能を活性化している可能性を示唆していると考えられる。そこで、DNA損傷のマーカーであるγH2AX fociの形成状態を解析したところ、レスベラトロールを処理した背景ではγH2AX fociの形成は顕著に抑制されていた (図3)。このことは、実際に、レスベラトロールの処理により、DNA損傷の修復が誘導されていることを示唆

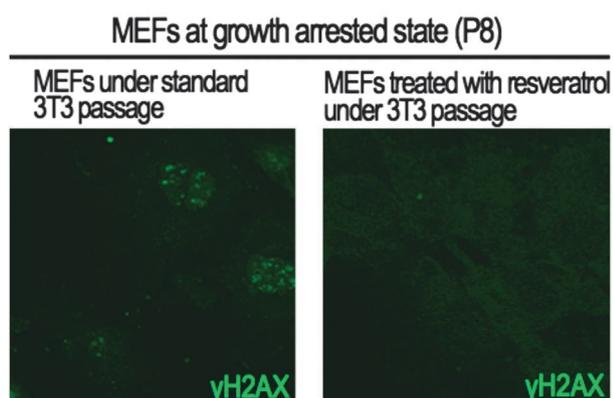


図3 レスベラトロール処理によるDNA修復に対する影響

正常細胞はH2AX低下に伴って増殖停止しているため、この状態の細胞はDNA修復能が低下している。ポリフェノールを処理によって $\gamma$ H2AXのフォーカスへの影響が観察された。

している。

次に、コーヒーポリフェノール・クロロゲン酸や玄米等に含まれるポリフェノール・アントシアニンによる“Factor Xの発現に対する影響”を上と同様に解析した。その結果、レスベラトロールの場合と同様に、“一過的なFactor Xの発現上昇”が、クロロゲン酸やアントシアニンの処理により誘導された(図2A, B)。このことから、クロロゲン酸やアントシアニンも、一過的にFactor X修復能を活性化し、ゲノム安定性に貢献している可能性が考えられる。

#### ポリフェノールによる細胞の不死化からの防御効果

ゲノム安定性に対する効果を明確にするために、ゲノム不安定性に伴って誘導されるMEF(マウス胎仔線維芽細胞)の不死化への影響を解析した。ここでは、レスベラトロール、アントシアニンあるいはクロロゲン酸を3日に1回添加し、MEFの不死化を防御する効果に対する影響を解析した。この結果、ポリフェノール(レスベラトロール、クロロゲン酸、アントシアニン)の定期的な添加により、MEFの不死化に対する防御効果がある可能性が示されている(現段階では終了していない)。重要なことに、MEFはゲノム不安定性を伴って不死化することが明確なことから<sup>2,3,6</sup>、ポリフェノールの定期的な添加により、もしも“MEFを不死化から防御する効果”が明確になった場合は、“ゲノム安定性を保持する効果”に伴う効果であると考えられる。

#### ポリフェノールによるがん予防効果の解析

上の実験で見出されたポリフェノールによるDNA修

復能の活性化に対する効果(ゲノム安定性に対する効果)に伴って、がんを防御する効果を検証するため、発がんの動物(マウス)モデル実験を、化学発がん物質であるBrK<sub>3</sub>を用いた腸管に発がんを誘導する実験系で実施し、この系での発がんに対するレスベラトロールによる効果を検証した。ここでは、BrK<sub>3</sub>は飲料水に加え、レスベラトロールは餌に含ませて、発がんに対する影響を解析することとした(現段階では終了していない)。今後、その効果を明確にし、この制がん効果の作用点が、DNA修復に伴う効果、ゲノム安定性に伴う効果、であるか否かを明確にすることを目指し、さらに解析を進める予定である。

#### 考 察

正常細胞は、増殖停止した静止状態を形成し、この状態で形質転換(不死化)から防御されている<sup>3,6</sup>。この状態は、ARF/p53経路の制御下でH2AXレベルが大きく低下した状態で形成されている<sup>6,7</sup>。実際、正常な臓器で認められる増殖停止した細胞でもH2AXレベルが大きく低下しており、臓器の恒常性は、この状態で維持されている<sup>3</sup>。H2AXレベルが抑制された細胞は、増殖停止した状態である一方で、DNA損傷の修復能が低下した状態に陥っている。このため、この状態の細胞は、DNA複製ストレスを伴う刺激によってゲノム不安定性が誘導されやすいことが示されている<sup>3,11</sup>。最近の我々の解析で、増殖停止細胞でも、放射線照射によって生じたDNA二重鎖切断は、一過的なH2AX誘導に伴って修復されることが見出された<sup>10</sup>。これは、静止状態の細胞での、DNA修復能の活性化機構である。本研究から、レスベラトロールなどのポリフェノールが、DNA修復能の活性化に関わる“Factor Xの一過的な発現”を誘導していること、これに伴って一過的にDNA修復能を活性化され、これがゲノム安定性の効果が現れると考えられる。Factor Xがゲノム安定性に必須の因子である点に鑑み、これらの結果は、ポリフェノールが、一過的なFactor X誘導を介して“DNA修復能の活性化”し、これに伴って“ゲノム安定性”に貢献していることを示唆している。

今後、がん予防効果に対する“DNA修復能の活性化”と“ゲノム安定性”との関係を明確にする必要があるが、現段階までの結果からは、ゲノムの安定性に対する効果が“生体の恒常性”に貢献し、結果として“がんの抑制効果”が現れている可能性が考えられる。

## 要 約

がんは、加齢がリスク要因となり、“ゲノム不安定性”と“ARF/p53経路等の変異”を伴って発症する疾患である。近年、食習慣の変化に起因して、がんの罹患率は大きく上昇してきた。加齢がリスク要因となるがんは、ゲノム不安定性と多数の変異（ARF/p53経路等）を伴って発症する。ポリフェノール類（レスベラトロール等）が、がん化と老化の両方を防御することが示唆されているが、この“がん予防効果”は、広く“ゲノム不安定性を伴って発症するタイプのがん”に対して認められている。このことから、ポリフェノールによる効果が、ゲノム不安定性に対する効果である可能性が考えられる。そこで本研究では、レスベラトロールなどのポリフェノールによる“ゲノム不安定性”と“がん抑制に対する作用点”を明確にすることを目指した。最近の我々の研究から、正常細胞の増殖停止はH2AX発現レベルの低下に伴って誘導されており、これがDNA修復能の低下とゲノム不安定性リスクの上昇の背景となっていることが示された。本研究では、ポリフェノールが、Factor Xを一過的に発現誘導する効果を示した。これに伴って、損傷DNAを修復する効果、ゲノム不安定性を維持する効果、細胞を不死化から防御する効果、が認められた。さらに、ポリフェノールによる“制がん効果”も認められ

つある。現段階で、ポリフェノールによる制がん効果の作用点が、本当に『一過的なFactor X発現に伴うDNA修復能の活性化効果（ゲノム不安定性に伴う効果）』であることを、明確に示すには至っていないが、この可能性を示唆しているものと考えられる。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) O. A. Sedelnikova, et al.: *Nature Cell Biol.*, **6**, 168–170, 2004.
- 2) Y. Ichijima, et al.: *PLoS ONE*, **5**, e8821, 2010.
- 3) Y. Atsumi, et al.: *PLoS ONE*, **6**, e23432, 2011.
- 4) H. Fujimori, et al.: *J. Biol. Chem.*, **287**, 36777–36791, 2012.
- 5) W. M. Bonner, et al.: *Nature Review Cancer*, **8**, 957–967, 2008.
- 6) T. Osawa, et al.: *BBRC*, **432**, 34–39, 2013.
- 7) Y. Atsumi, et al.: *J. Biol. Chem.*, **288**, 13269–13277, 2013.
- 8) K. Yoshioka, et al.: *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 6492–6506, 2012.
- 9) K. Yoshioka, et al.: *World J. Stem. Cells*, **7**, 483–489, 2015.
- 10) Y. Atsumi, et al.: *Cell Reports*, **13**, 2728–2740, 2015.
- 11) Y. Minakawa, et al.: *Genes Cells*, **21**, 789–797, 2016.